

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Легоцкого Сергея Александровича «Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и разработка способа эффективного лизиса грамотрицательных бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Легоцкого С.А. посвящена исследованию эндолизина бактериофага S-394, подбору условий для ферментативного лизиса живых бактерий и разработке метода стабилизации фермента.

Актуальность темы диссертации.

В настоящее время инфекции бактериального происхождения являются весомой угрозой здоровью и благополучию человека. Среди дополнительных факторов, которые усугубляют проблему, можно отметить замедление выпуска на рынок новых антибиотиков и развивающаяся повсеместно устойчивость бактерий к существующим антибиотикам. Сложившаяся ситуация несет в себе значительные риски ухудшения качества бактериальных инфекций в будущем и является предметом особого внимания со стороны лидеров развитых стран и Всемирной Организации Здравоохранения. Использование бактериофагов и их цитолитических ферментов в качестве антибактериальных средств рассматривается, как перспективное средство борьбы с патогенами, резистентными к современным антибиотикам.

В задачи диссертационной работы входило получение эндолизина бактериофага S-394 (получил название Lys394) в рекомбинантном виде, оптимизация условий экспрессии с целью максимизации выхода белка, изучение физико-химических свойств Lys394 подбор вспомогательных веществ для ферментативного лизиса «извне» клеток *E. coli*, изучение особенностей термоинактивации и стабилизация фермента.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Диссертационная работа Легоцкого С.А. выполнена на высоком современном экспериментальном уровне с привлечением широкого спектра методов молекулярной биологии, биохимии, микробиологии, энзимологии. Все результаты экспериментов задокументированы и обработаны корректными статистическими методами. Результаты работы послужили основой для двух патентов РФ, что говорит об их научной новизне. Выводы диссертации четко соответствуют целям и задачам и логично вытекают из полученных результатов.

Ценность полученных результатов для науки и практики

В ходе диссертационной работы автор клонировал ген ранее неопisanного эндолизина Lys394, получен гомогенный препарат фермента в активном растворимом виде.

Применение эндолизинов для лизиса грамотрицательных бактерий «извне» затруднено по причине того, что субстрат эндолизинов (пептидогликан) покрыт снаружи дополнительной липидной мембраной, предотвращающей доступ фермента. Результаты, полученные автором, говорят о том, что ферментативный лизис грамотрицательных бактерий возможен в присутствии вспомогательных агентов. Наиболее эффективными агентами, среди протестированных автором, оказались PGLa (антимикробный пептид) и поли-*L*-аргинин. Причем, эффективность PGLa показана как на культуре планктонных, так и на культуре газонных клеток *E. coli*. Примечательно, что автор по итогам экспериментов по лизису живых бактерий, намечает дальнейший вектор возможного развития работы в виде подбора менее токсичных пептидов и получения конъюгатов фермент-пептид.

Большое прикладное значение имеют разработанные автором методы стабилизации Lys394, основанные на подробном и методичном анализе физико-химических закономерностях инактивации Lys394.

Структура и текст диссертации

Структура диссертации Легоцкого С.А. традиционна. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в ходе исследований, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы.

Работа изложена на 151 странице, содержит 43 рисунка, 9 таблиц, список цитируемой литературы насчитывает 222 источника.

Во введении Легоцкий С.А. подробно обсуждает актуальность работы и научную новизну, формулирует цели и задачи исследования. Обзор литературы широко освещает теоретические аспекты, которые легли в основу проведенного эксперимента. В начале литературного обзора автор освещает особенности строения бактериальных пептидогликанов, их межвидовую вариативность и изменчивость в зависимости условий культивирования. Далее приводится классификация ферментов, вызывающих лизис пептидогликанов и их примеры. В следующем разделе описано строение внешней липидной мембраны грамотрицательных бактерий. Эта тема, как и заключительный раздел про стабильность и стабилизацию ферментов, описана чрезмерно подробно с описанием множества деталей, которые даже в первом приближении не были затронуты в экспериментальной части. Это относится, к примеру, к разделу 2.3 о белках, входящих в состав внешней мембраны *E. coli*. И даже если литературный обзор нельзя назвать компактным, тем не менее, он вполне информативен и удачно предваряет экспериментальную часть диссертации.

Первая часть исследования, осуществленная Легоцким С.А., заключается в применении генно-инженерных техник с целью получения активного фермента Lys394, достаточно подробное исследование его физико-химических свойств и субстратная специфичность. Не смотря на то, что подобный порядок действий достаточно типичен для подобного рода исследований и в некотором роде представляет собой набор рутинных процедур, можно заметить, что автор выполнил их очень добротнo.

На следующем этапе автор решал вопрос о применении фермента снаружи клеток. В случае грамотрицательных бактерий применение эндолизинов снаружи клетки не вызывает лизиса, так как пептидогликан таких бактерий покрыт сверху дополнительной липидной мембраной. Сначала автор протестировал ряд вспомогательных веществ на их способность увеличивать проницаемость внешней мембраны. Для этого был использован тест, основанный на детекции β -лактамаз в норме находящихся в периплазматическом пространстве. На этом этапе наиболее эффективными оказались пептид PGLa и поли-L-аргинин фракции 5 – 15 кДа.

Далее в присутствии каждого из этих веществ был протестирован лизис бактерий под действием Lys394. Примечательно, что для газонных и планктонных клеток в этом эксперименте оптимальные соотношения компонентов реакции оказались существенно разными.

Третья глобальная задача исследования касалась изучения стабильности и стабилизация фермента Lys394. Конечно, ведь для потенциального внедрения фермента в практическое использование необходим достаточно длительный срок хранения препарата. Здесь автор, основываясь на физико-химических особенностях строения белков и закономерностях термоинактивации, подобрал комбинацию стабилизаторов, увеличивающих срок хранения белкового препарата с 3,5 до 150 суток при 37 °С, то есть приблизительно в 50 раз,

Автореферат диссертации содержит основные положения диссертации и полностью соответствует требованиям ВАК РФ.

Замечания по диссертации

Диссертация Легоцкого С.А. не содержит существенных недостатков, однако нельзя не отметить отдельные замечания и пожелания

1. Не на всех рисунках и таблицах диссертации приведены доверительные интервалы значений. (рис.29, 41,42, 43 и др)
2. Относительно очистки рекомбинантных белков с гексагистиридиновыми вставками. (стр.104-105). Желательно было бы привести электрофорез фракции элюированной 70 мМ имидазола для лучшей иллюстрации селективности метода. Сам метод лучше называть металло-хелат аффинной хроматографией, а не Ni-аффинной (частный случай)
3. Представляется весьма интересным метод стабилизации фермента поликатионами (стр.134). Этот подход на мой взгляд интересно было бы расширить и реализовать его с использованием природного поликатиона - хитозана с низкой молекулярной массой (2-10 кДа). Это в качестве пожелания на будущее.

